

N. 007K. 14 635

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 550 204

(21) N° d'enregistrement national :

84 12303

(51) Int Cl⁴ : C 07 K 7/10; A 61 K 37/02.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 3 août 1984.

(30) Priorité : JP, 5 août 1983, n° 58-144016 et 13 juillet 1984, n° 59-144114.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 6 du 8 février 1985.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA — JP.

(72) Inventeur(s) : Kaoru Morita, Shigeo Katsuragi et Toshiharu Noda.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin, Schrimpf, Warcoin, Ahner.

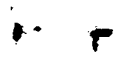
(54) Dérivés peptidiques de [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH.

(57) L'invention concerne des dérivés nouveaux peptidiques d'hormones parathyroïdiennes humaines (h-PTH). Plus particulièrement, l'invention concerne [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂ et [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34)NH₂ qui sont des médicaments efficaces pour le traitement des maladies impliquant l'hypoparathyroïdisme ou PTH.

De façon caractéristique, le peptide répond à la formule :
H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn
-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg
-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp
-Val-His-Asn-A-NH₂,

dans laquelle A représente Tyr ou Phe, ou un sel de celui-ci.

1707K201:00



N: C07K. 14/635

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 550 204

(21) N° d'enregistrement national :

84 12303

(51) Int Cl⁴ : C 07 K 7/10; A 61 K 37/02.

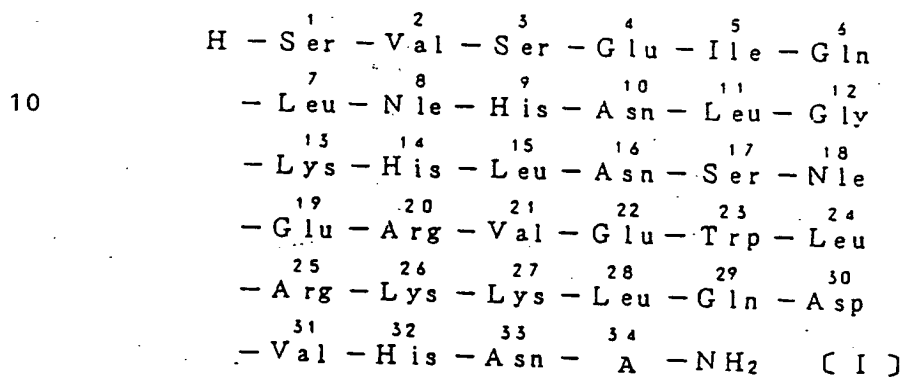
| No | DOC | références, formules, pages à photocopier, etc | No | classement |
|----|---------------------------------|--|----|-----------------------|
| 2 | pg. 17, 35, 46 | | 1 | 124 BG-12B4H4B32 |
| 3 | pg. 18 | | 2 | 124 BG-12B4H3B2C1 |
| 4 | pg. 19 | | 3 | 124 BG-12B4H3B3H |
| 5 | pg. 20-21, 25-27, 32, 33, 38-39 | | 4 | 124 BG-12B4H3B4A1 |
| 6 | pg. 22 | | 5 | 124 BG-12B4H4B327 |
| 7 | pg. 23, 30 | | 6 | 124 BG-12B4H3B2B |
| 8 | pg. 24 | | 7 | 124 BG-12B4H3B3B |
| 9 | pg. 31, 48 | | 8 | 124 BG-12B4H3B4B |
| 10 | pg. 36, 47 | | 9 | 124 BG-12B4H3B4C |
| 11 | pg. 36, 42 | | 10 | 124 BG-12B4H3B3A1 |
| 12 | pg. 47 | | 11 | 124 BG-12B4H3B4H |
| | | | 12 | 124 BG-12B4H3B3C7 |
| | | | B. | 1 → 12 C07C 103/52 |

Modèle 350

FR 2

M07K201:00

La présente invention concerne des dérivés nouveaux peptidiques d'hormones parathyroïdiennes humaines (h-PTH). Plus particulièrement, l'invention concerne [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂ et [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34)NH₂ qui sont des médicaments efficaces pour le traitement des maladies impliquant l'hypoparathyroidisme ou PTH, et lesdits composés sont représentés par la formule suivante :



15 dans laquelle A représente Tyr ou Phe, ou un sel de celui-ci.

La présente invention englobe également un composé radioactif marqué iode-125 du peptide [I] dans lequel A représente Tyr, en raison de son utilité pour les diagnostics de la fonction de la glande parathyroïdienne.

20

L'hormone parathyroïdienne humaine est une hormone peptidique consistant en 84 amino-acides et son activité biologique est révélée par le résidu de 34 amino-acides de son résidu N-terminal à savoir h-PTH(1-34) [Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 68, 63-67 (1971)]. Cependant, h-PTH est instable en raison de la L-méthionine existante (Met) et elle perd son activité hormonale quand elle est marquée avec iode-125 (Recent Prog. Hormone Res., 18, 269-295, 1962).

Pour remédier à cet inconvénient, on a créé les dérivés peptidiques de h-PTH ayant une activité PTH, tels que [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH (demande non examinée de brevet japonais 55-113753) et h-PTH(1-34)NH₂ (demande non examinée de brevet japonais 58-96052) dans lesquelles la L-méthionine dans les positions 8 et 18 est remplacée par la L-norleucine. Il est cependant fâcheux que l'activité PTH de [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34) soit approximativement égale mais pas supérieure à celle de h-PTH naturelle, et aussi h-PTH (1-34) est instable à l'oxydation par suite de la méthionine dans sa molécule.

La Demanderesse a fait des recherches sur les dérivés peptidiques de h-PTH ayant une activité et une stabilité supérieures. On a constaté que le peptide ci-dessus (I), à savoir [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂ et [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34)NH₂ ne possède pas seulement une plus forte affinité pour le récepteur de PTH par comparaison avec h-PTH(1-34) et [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34)

connues et une activité environ 1,5 à 2 fois plus forte h-PTH, mais aussi une activité immune et une stabilité. Le composé [I] de la présente invention est un médicament efficace pour le traitement des maladies osseuses impliquant l'hypoparathyroïdisme ou PTH.

D'autre part, selon le procédé de titrage antérieur de h-PTH, pour titrer le fragment peptidique ayant une activité h-PTH, on a préparé un anticorps particulier contre l'antigène de h-PTH (1-34). Cependant, comme expliqué précédemment, il existe des inconvénients en ce que h-PTH(1-34) est instable par suite de la présence de la L-méthionine et, par conséquent, quand on marque avec l'iode-125, la méthionine dans les positions 8 et 18 est oxydée et perd son activité hormonale. Le dérivé h-PTH ayant une activité h-PTH, une activité immune contre l'antigène d'anti-PTH, une activité hormonale stable lors du marquage avec iode-125 et une radioactivité stable, [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34) dans laquelle la méthionine dans les positions 8 et 18 est remplacée par la L-norleucine et la L-phénylalanine et en position 34 est remplacée par la L-tyrosine, a été trouvé (Demande non examinée et publiée de brevet japonais 55-113753). Ledit peptide ne perd pas son activité lors du marquage avec l'iode-125 car il ne contient pas de méthionine dans sa molécule, mais son activité hormonale est seulement à peu près égale à celle de la h-PTH(1-34) naturelle.

On a trouvé que le peptide I de la présente invention
[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂ dans lequel A dans
le peptide I ci-dessus est Tyr, n'a pas perdu son activité
PTH, possède une radioactivité deux fois plus forte par
5 comparaison avec celle de [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)
et n'a pas perdu son activité biologique lors d'un stockage
prolongé et constitue donc un peptide efficace d'un composé
de marquage pour diagnostic de la fonction paralyroïdienne.

On peut synthétiser comme suit le peptide I de
10 l'invention.

On convertit un groupe carboxylique de tyrosyle ou
phénylalanine C-terminal en amide et on fait réagir
l'acide-amino protégé et/ou le peptide inférieur par conden-
sation en phase liquide dans l'ordre de la séquence
15 d'acides-amino de formule I, et on libère le groupe pro-
tecteur du groupe amino N-terminal et le groupe réactif
de la chaîne latérale au stade final de la réaction par
décomposition acide.

On peut effectuer la réaction de condensation par
20 une synthèse de peptide classique en répétant la fixation
et l'enlèvement des groupes protecteurs et la condensation.
Les groupes protecteurs pour la synthèse des matières de
départ ou des intermédiaires sont classiques pour la
synthèse des peptides et sont faciles à enlever par hydro-
25 lyse, décomposition de l'acide, réduction, aminolyse ou
hydrazinolyse.

Par exemple, on peut protéger le groupe amino de façon classique par un groupe acyle tel que formyle, trifluoracétyle, phtaloyle, p-toluènesulfonyle ou o-nitrophényl-sulfonyle; un groupe benzyloxycarbonyle, tel
5 que benzyloxycarbonyle, o-bromobenzyloxycarbonyle, p-bromobenzyloxycarbonyle, o- (ou p-) chlorobenzyloxy-carbonyle, p-nitrobenzyloxycarbonyle ou p-méthoxybenzyl-oxy-carbonyle, un groupe oxycarbonyle aliphatique tel que trichloréthylloxycarbonyle, t-amylloxycarbonyle, t-butoxy-
10 carbonyle ou diisopropylméthoxycarbonyle ; ou un groupe aralkyloxycarbonyle tel que 2-phénylisopropoxycarbonyle, 2-tolylisopropoxycarbonyle ou 2-p-diphénylisopropoxy-carbonyle. On peut protéger ces groupes amino en formant une énamine qu'on fait réagir avec 1,3-dicétone telle que
15 benzoylacétone ou acétylacétone.

On peut protéger le groupe carboxyle par formation d'amides, formation d'hydrazides ou estérification. On substitue le groupe amide par un groupe 3,4-diméthoxy-benzyle ou bis-(p-méthoxyphényl)-méthyle. On substitue
20 le groupe hydrazide par un groupe benzyloxycarbonyle, trichloréthylloxycarbonyle, trifluoracétyle, t-butoxy-carbonyle, trityle ou 2-p-diphényl-isopropoxycarbonyle. On substitue le groupe ester par un alcanol comme le méthanol, éthanol, t-butanol ou alcool cyanométhylque;
25 un aralcanol tel qu'alcool benzylique, alcool p-bromo-benzylique, alcool p-chlorobenzylique, alcool p-méthoxy-benzylique, alcool p-nitrobenzylique, alcool 2,6-di-

chlorobenzylrique, alcool benzhydrique, alcool benzoyl-méthylrique, alcool p-bromobenzoylméthylrique ou alcool p-chlorobenzoylméthylrique ; un phénol tel que 2,4,6-trichlorophénol, 2,4,5-trichlorophénol, pentachlorophénol, 5 p-nitrophénol ou 2,4-dinitrophénol ; ou un thiophénol tel que thiophénol ou p-nitrothiophénol. Le groupe hydroxy est la sérine, ou bien on peut facultativement protéger la tyrosine par estérification ou éthérification. Un groupe protégé par estérification est, par exemple, 10 un groupe acétyle ; un groupe benzoyle, benzyloxycarbonyle ou éthyloxycarbonyle. Un groupe protégé par éthérification est, par exemple, un groupe benzyle, 2,6-dichlorobenzyle, tétrahydropyranyle ou t-butyle. La protection du groupe hydroxy peut se faire par un groupe 2,2,2-trifluor-1- 15 t-butyloxycarbonylaminoéthyle ou 2,2,2-trifluor-1-benzyl-oxycarbonylaminoéthyle. Il n'est cependant pas toujours nécessaire de protéger ces groupes hydroxy.

Le groupe amino dans le groupe guanidino dans l'arginine peut être protégé par un groupe nitro, tosyle, 20 benzyloxycarbonyle ou méthylène-2-sulfonyle. Il n'est cependant pas toujours nécessaire de protéger ce groupe guanidino.

Le groupe imino dans l'histidine peut être protégé par un groupe benzyle, trityle, benzyloxycarbonyle, 25 tosyle, 2,2,2-trifluor-1-benzyloxycarbonylaminoéthyle, bien que le groupe imino n'exige pas toujours de protection.

Dans la présente invention, les groupes protecteurs préférés sont t-butyloxycarbonyl et t-amylloxycarbonyl pour le groupe α -amino ; O-chlorobenzylloxycarbonyl pour le groupe amino de la chaîne latérale, c'est-à-dire

5 ϵ -amino dans la lysine; l'ester benzylique, éthylique ou phénacylique pour un groupe α -carboxyle; l'ester benzylique pour un groupe carboxyle de la chaîne latérale, c'est à dire glutamate et aspartate ; un groupe benzylique pour hydroxyle dans la sérine ; 2,6-dichlorobenzyle pour

10 l'hydroxyle dans la tyrosine ; et le groupe tosyl ou méthylène-2-sulfonyl pour le groupe amino dans guanidino de l'arginine.

On synthétise le peptide (I) par condensation d'amino acides ou de peptide inférieur. Par exemple, on fait réagir

15 un amino-acide ou peptide ayant un groupe α -amino protégé et un groupe carboxylique terminal activé avec un amino-acide ou un peptide ayant un groupe α -amino libre et un groupe carboxylique terminal protégé. D'autre part, on fait réagir un amino-acide ou peptide ayant un

20 groupe α -amino-activé et un groupe carboxylique terminal protégé avec un amino-acide ou peptide ayant un groupe carboxylique terminal libre et un groupe α -amino protégé.

On peut activer le groupe carboxylique par un azide d'acide, un anhydride d'acide, un imidazolide

25 d'acide ou un ester actif, par exemple, en convertissant en ester cyanométhyle, thiophénylique, p-nitrophénylique,

p-nitrothiophénylique, 2,4-dinitrophénylique, 2,4,5-trichlorophénylique, 2,4,6-trichlorophénylique, pentachlorophénylique ainsi qu'un ester de N-hydroxysuccinimide, un ester N-hydroxyphtalimido, un carbodiimide tel que N,N'-
5 dicyclohexylcarbodiimide, N-éthyl-N'-3-diméthylaminopropylcarbodiimide, N,N'-carbobyldiimidazole ou un sel d'isoxazolium tel qu'un réactif de Woodward.

Les réactions préférées de condensation sont les procédés par l'azide, l'ester actif et le carbodiimide.
10 Dans la réaction de condensation, on doit soigneusement éviter la racémisation, et les procédés préférés sont le procédé à l'azide, le procédé à l'ester actif ou procédé de Wunsch [Z. Naturforsch., 216, 426 (1966)] ou le procédé de Geiger [Chem. Ber., 103, 788 (1970)] surtout
15 en utilisant le N-éthyl-N'-3-diméthylaminopropyl-carbodiimide (WSCl) à titre d'agent de condensation.

On fait précéder le procédé de l'invention d'une réaction de condensation dans la séquence d'acides aminés de formule I et on préfère synthétiser à partir du terminal C.
20

Par exemple, on préfère synthétiser le fragment terminal C de la séquence d'acides aminés 29-34 avec la séquence 23-28 des fragments de peptide. La condensation préférée du fragment terminal C avec l'hexapeptide 23-
25 28 se fait par un procédé modifié de Geiger en utilisant WSC. On effectue avantageusement la condensation du fragment terminal C obtenu 23-24 avec le fragment peptide de

la séquence d'acides-amino 18 à 22 par un procédé modifié de Geiger utilisant WSC. Le fragment terminal C 18-34 ainsi obtenu est relié un par un avec un fragment peptidique de la séquence 13-17, un fragment peptidique 8-12 et un fragment peptidique 1-7.

Dans la réaction de condensation ci-dessus, un groupe protecteur pour le groupe α -amino, par exemple t-butyloxy-carbonyl et t-amyloxy-carbonyl, est enlevé par l'acide trifluoracétique. Un groupe protecteur pour α -carboxyle, par exemple l'ester éthylique, est hydrolysé par une solution diluée d'hydroxyde de sodium ou est converti en un hydratide protégé tel que l'hydratide ou le trichloréthoxy-carbonyl-hydratide. On décompose l'ester phénacylique par une poudre de Zn en acide acétique et on enlève l'ester benzylique par l'acide fluorhydrique anhydre ou par hydrogénation ou on le convertit en hydratide.

Ainsi, on peut obtenir un tétratriacontapeptide ayant un groupe α -amino N-terminal protégé, un groupe ϵ -amino, un carboxyle de chaîne latérale, guanidino et/ou hydroxyle. Ces groupes protecteurs sont avantageusement séparés par décomposition acide, par exemple l'enlèvement en un stade par l'acide fluorhydrique anhydre ou le sulfonate de trifluorométhane pour obtenir le composé correspondant de formule I.

On peut purifier le peptide ainsi obtenu I par des procédés bien connus de purification de peptides ou de protéines. Par exemple, on peut purifier par filtration sur

gel en utilisant "Sephadex" G-25, G-50 ou LH-20 (marques déposées), la chromatographie sur colonne en utilisant une carboxyméthylcellulose ou une résine échangeuse d'ions, ou la chromatographie liquide à haute performance.

5 On peut obtenir le peptide I de l'invention sous forme d'une base libre ou de son sel, par exemple son sel avec un sel minéral ou organique tel que le formiate, acétate, propionate, glycolate, succinate, malate, tartrate ou citrate.

10 Le peptide I peut former un complexe par addition d'une substance minérale ou organique. Il s'agit d'un complexe qu'on obtient en ajoutant une substance d'un certain type et c'est un complexe inconnu qui peut participer à l'effet de retard sur le peptide. On peut
15 mentionner par exemple un composé minéral dérivé du calcium, magnésium, aluminium, cobalt ou zinc, surtout un sel légèrement soluble d'un tel métal, comme le phosphate, le pyrophosphate ou le polyphosphate ou encore un hydroxyde ou polyphosphate d'un métal alcalin.

20 Le peptide I, c'est-à-dire $[Nle^8, Nle^{18}, Tyr^{34}]$ -h-PTH(1-34)NH₂ est utile comme un composé marqué pour un immunotitrage radioactif. Par exemple, on ajoute ce peptide I et une chloramine T à une aliquote radioactive d'iode-125 dans un tampon phosphaté (pH 7,1), on agite le
25 mélange, on ajoute du disulfure de sodium et on ajoute également une petite quantité d'iodure de potassium et d'albumine sérique. Les fractions marquées à l'iode-125 sont

recueillies par chromatographie pour obtenir un composé conjugué d'iode-125.

On ajoute une solution (10 μ l) de h-PTH(1-34) (2 μ g), h-PTH(1-34)NH₂ (2 μ g), [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34) (2 μ g) ou [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂ (2 μ g) et une solution (20 μ l) de chloramine T (3,5 mg/ml) à un tampon phosphaté 0,5M (pH 7,1, 50 μ l) contenant iode-125-NaI (radioactivité : 2 mCi), on agite le mélange pendant 30 secondes et on ajoute 4,5 mg/ml de bisulfure de sodium en solution (50 μ l) pour arrêter la réaction. On ajoute une solution 0,1N d'acide acétique (0,5 ml) contenant 5% d'albumine sérique humaine et on charge le mélange sur une colonne (1 x 50 cm) de Sephadex G-10, puis on élue avec une solution au dixième d'acide acétique pour obtenir des composés marqués.

Titrage de l'activité de PTH

(1) préparation d'un récepteur de PTH

On saigne par décollation des rats mâles de la souche SD pesant 200 à 250 g, on leur fait une laparotomie et on excise les reins. On enlève une membrane superficielle, on découpe le cortex rénal et on refroidit à la glace. Les opérations suivantes doivent se dérouler à une température aussi basse que possible (0 à -4°C).

On immerge le cortex rénal dans une solution (qu'on appellera solution A) de 10 mmoles de tampon tris-HCl (pH 7,5) contenant 0,25 mole de saccharose et 1 mmole de EDTA. On ajoute trois fois le volume de la solution A (ml)

sur le cortex rénal (poids mouillé) à un cortex rénal dans un tube de verre avec un pilon en Teflon (marque déposée) et on homogénéise.

On soumet un homogénat à une centrifugation pendant 5 10 minutes à $150 \times G$ et on soumet la solution surnageante à une autre centrifugation pendant 15 minutes à $2200 \times G$. On met au rebut la solution surnageante et on met en suspension dans la solution A une partie supérieure de l'émulsion du précipité. On soumet cette émulsion à une 10 centrifugation pendant 15 minutes à $2200 \times G$. On met de nouveau le précipité en suspension et on congèle à $-70^{\circ}C$ dans une bouteille emmagasinée à $-20^{\circ}C$.

(2) Réaction avec PTH et récepteur de PTH

On dissout l'échantillon dans 100 mmoles de tampon 15 tris-HCl (pH 7,5) contenant 2 mmoles de ATP-Mg, 10 mmoles de $MgCl_2$, 60 mmoles de KCl, 20 μ moles de GTP, 1 mmole de butylméthylxanthine, 8 mmoles de phosphate de créatine et 0,2% d'albumine de sérum bovin (ASB) pour préparer une solution à 2 μ g/ml et 10 μ g/ml. On prépare 20 également par la même technique une solution bovine normalisée PTH(1-34).

On place ces solutions [2 μ g/ml et 10 μ g/ml, échantillon et PTH(1-34) bovine] (50 μ l) dans des tubes d'essai en verre, chacune pour huit tubes et on conserve 25 dans l'eau glacée afin d'empêcher ATP et d'autres de former des solutions d'essai.

Une solution de référence du récepteur de PTH em-

magasinée à -20°C est décongelée à température ambiante. On ajoute la kinase de créatine préalablement dissoute dans la solution A pour préparer la kinase de créatine à $0,1\text{ mg/ml}$ et on prépare un récepteur de PTH à $1,4\text{ mg/ml}$ sous forme d'une protéine en ajoutant la solution A et en maintenant cette solution avec refroidissement à la glace. Après la préincubation à 37°C pendant plusieurs minutes des solutions de test ci-dessus, on ajoute la solution de récepteur de PTH et la solution de kinase de créatine à raison de $50\text{ }\mu\text{l}$ chacune et on incube à 37°C pendant 10 minutes. On ajoute un tampon d'acétate $0,1\text{ M}$ ($100\text{ }\mu\text{l}$, $\text{pH } 4,0$), puis on place immédiatement dans l'eau glacée et ensuite on chauffe le tube dans l'eau bouillante pour arrêter la réaction.

15 (3) Titrage de c-AMP engendré.

On ajoute de l'eau distillée à la solution ci-dessus (réaction arrêtée) avec une dilution de 10 à 30 fois et on déprotéinise par centrifugation pendant 15 minutes à $2000 \times \text{G}$. On titre une certaine quantité de c-AMP dans une solution surnageante à l'aide d'une trousse RIA (YAMASA SHOYU CO.)

(4) Détermination de l'activité de PTH.

On convertit les valeurs mesurées de c-AMP en une unité de pM (pico mole)/mg récepteur de PTH (protéine)/minute comme désignation de la valeur mesurée. On teste de façon comparative la valeur mesurée par rapport à une norme selon une ligne de titrage parallèle deux par deux.

(5) Activité de PTH (U/mg) :

| ECHANTILLON | ACTIVITE DE PTH | ACTIVITE DE PTH APRES MARQUAGE AVEC IODE - 125 |
|--|--------------------|--|
| h-PTH | 3000 | >100 |
| h-PTH(1-34)NH ₂ | 5100 | >150 |
| [Nle ⁸ , Nle ¹⁸ , Tyr ³⁴]- h-PTH(1-34) | 2930 | 2480 |
| [Nle ⁸ , Nle ¹⁸ , Tyr ³⁴]- h-PTH(1-34)NH ₂ | 5030 | 5000 |
| [Nle ⁸ , Nle ¹⁸]-h-PTH(1-34)NH ₂ | 5000 | - |

Les abréviations utilisées ont les significations
suivantes :

- Boc : t-butyloxycarbonyle
- 5 OPAC : ester phénacylique
- Bzl : benzyle
- Val : L-valine
- OEt : ester éthylique
- OBzl : ester benzylique
- 10 Trp : L-tryptophane
- Ser : L-sérine
- Leu : L-leucine
- Bzl-Cl₂ : 2,6-dichlorobenzyle
- Arg : L-arginine
- 15 DCHA : dicyclohexylamine
- Lys : L-lysine
- NaOH : hydroxyde de sodium.

- Tyr : L-tyrosine
TosOH : acide p-toluènesulfonique
TFA : acide trifluoracétique
THF : tétrahydrofuranne
5 NMM : N'-méthylmorpholine
WSC : N-éthyl-N'-diméthylaminopropyl-carbodiimide
Aoc : t-amyloxy-carbonyl
Z-Cl : o-chlorobenzoyloxy-carbonyl
Tos : tosyl
10 Ile : L-isoleucine
ONP : ester p-nitrophénylique
Nle : L-norleucine
Phe : L-phénylalanine
Glu : acide L-glutamique
15 Z(OMe) : p-méthoxybenzoyloxy-carbonyl
Asp : acide L-aspartique
Gly : glycine
Gln : L-glutamine
His : L-histidine
20 DMSO : dicyclohexylamine
DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
Et₃N : triéthylamine
éther : éther diéthylique
DMF : diméthylformamide
25 TBA : t-butylamine
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

PF () : PF désigne un fragment protégé d'amino-acide ou de peptide. Les nombres entre parenthèses désignent les séries de la séquence des amino-acides dans la formule I.

Les exemples suivants servent à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée. Dans ces exemples, on utilise les supports et les éluants suivants pour la chromatographie en couche mince (ccm) :

Support : gel de silice G

10 Eluant :

1. Chloroforme/méthanol/acide acétique (95:5:3)
2. Chloroforme/méthanol/acide acétique (85:15:5)
3. Chloroforme/méthanol/acide acétique (80:25:2)
4. Chloroforme/éthanol/acétate d'éthyle (5:2:5)

15 5. Hexane/acétate d'éthyle (1:1)

Support : cellulose Merck (DC-Alufolien)

Eluant :

6. Butanol/pyridine/acide acétique/eau (2:2:2:3)
(couche supérieure)

20 [Analyse de l'amino-acide]

Sauf stipulation contraire, on hydrolyse l'échantillon dans HCl hexanormal à 110°C pendant 24-48 heures dans un tube hermétiquement fermé.

Exemple 1

25 Préparation de [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂

1) PF(34) : Boc-Tyr(Bzl-Cl₂)-NH₂ [1]

On ajoute goutte à goutte 24,76 g (0,12 M) de DCC

dans THF sec à -5°C dans 52,84 g (0,12 M) de Boc-Tyr(Bzl- Cl_2)-OH et 16,6 g (0,12 M) de p-nitrophénol dissous dans THF sec, puis on agite pendant 16 heures, on élève les précipités, on sature avec NH_3 gazeux dans la solution de filtrat et on agite pendant 5 heures. On dissout les précipités suivants en ajoutant DMF et on concentre sous vide. On cristallise le résidu dans l'éther, on filtre et on sèche pour obtenir le produit [1].

Production : 44,77 g (rendement 84,9%)

10 P.F : $214-216^{\circ}\text{C}$

ccm : $\text{Rf}_1 = 0,62$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}_2$) :

| | C% | H% | N% |
|-----------|-------|------|------|
| Calculé | 57,41 | 5,51 | 6,38 |
| 15 Trouvé | 57,42 | 5,59 | 6,51 |

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: $-5,54^{\circ}$ ($c = 1$, DMF)

2)PF(33-34) : Boc-Asn-Tyr(Bzl- Cl_2)- NH_2 [2]

On ajoute 100 ml de TFA avec refroidissement à la glace au composé (I) (26,36 g) (60 mmoles) dissous dans du chlorure de méthylène et on agite à température ambiante pendant 30 minutes. On élimine sous vide le chlorure de méthylène et le TFA, on cristallise le résidu dans l'éther, on filtre et on sèche. On ajoute 10,98 ml (60 mmoles) de WSC à -15°C aux cristaux ainsi obtenus, 13,93 g (60 mmoles) de Boc-Asn-OH et HOBt (8,1 g, 60 mmoles) dissous dans DMF et on agite pendant 16 heures. On recueille les précipités par filtration, on lave avec du

bicarbonate de sodium aqueux à 5%, de l'eau (deux fois)
 et du méthanol, dans cet ordre et on sèche pour obtenir
 le produit [2]. On distille sous vide la liqueur-mère pour
 éliminer DMF et on lave les cristaux obtenus avec de l'eau
 5 et du méthanol, puis on sèche pour obtenir le produit
 [2] qu'on combine avec le produit ci-dessus

Production 28,64 g (rendement 86,25%)

P.F. : 240-242° C

$[\alpha]_D^{25}$: -24,06° (c = 1, DMF)

10 Analyse élémentaire ($C_{25}H_{30}O_6N_4Cl_2$)

| | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|-------|
| Calculé | 54,25 | 5,46 | 10,13 |
| Trouvé | 54,46 | 5,38 | 10,31 |

3) PF(32-34) : Boc-His(Tos)-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)-NH₂ [3]

15 On ajoute 100 ml de TFA avec refroidissement à la
 glace à 22,14 g (40 mmoles) du composé (2) dissous dans
 une petite quantité de chlorure de méthylène, on agite à
 température ambiante pendant 30 minutes et on élimine
 TFA sous vide pour obtenir le composé de-Boc.

20 On lave 28,36 g (48 mmoles) de BocHis(Tos)-OH.DCHA
 en suspension dans 500 ml d'acétate d'éthyle avec de
 l'acide sulfurique normal (deux fois) et de l'eau (deux
 fois), on sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on
 élimine l'acétate d'éthyle sous vide. On ajoute le
 25 composé précité de-Boc dissous dans le DMF sec et 6,48 g
 (48 mmoles) de HOBt au résidu dissous dans DMF, puis on

ajoute 8,78 ml (48 mmoles) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. Une fois la réaction terminée, on élimine DMF sous vide et on lave le résidu avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et deux fois
 5 avec de l'eau, puis on sèche pour obtenir le produit brut qu'on recristallise dans un mélange de méthanol et d'éther pour obtenir le produit [3]. On concentre la liqueur-mère sous vide, on cristallise le résidu dans un mélange de méthanol et d'hexane pour ob-
 10 tenir le composé [3] qu'on combine avec le produit [3] ci-dessus.

Production : 28,81 g (rendement : 85,1%)

P.F : $170-175^{\circ}\text{C}$

ccm : $Rf_3 = 0,68$, 0,42 (Tos partiellement éliminé)

15 Analyse élémentaire ($\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_9\text{N}_7\text{Cl}_2\text{S}$)

| | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|-------|
| Calculé | 53,96 | 5,24 | 11,59 |
| Trouvé | 53,03 | 5,65 | 12,04 |

4) PF(31-34) : Boc-Val-His-Asn-Tyr(Bzl- Cl_2)- NH_2 [4]

20 On ajoute 120 ml de TFA avec refroidissement à la glace à 28,81 g (34,06 mmoles) du composé [3] dissous dans une petite quantité de chlorure de méthylène, on agite à température ambiante pendant 10 minutes et on élimine TFA sous vide. On ajoute de l'éther au résidu
 25 et on recueille par filtration les cristaux précipités, on sèche et on dissout dans 140 ml de DMF. On neutralise la solution avec NMM. On ajoute une solution de 8,14 g

(37,47 mmoles) et 5,06 g (37,47 mmoles) de HOBt dissous dans 60 ml de DMF, puis on ajoute 6,86 mm³ (37,47 mmoles) de WSC à -15°C et on agite pendant 16 heures à température ambiante. On élimine DMF sous vide et on lave le
 5 résidu avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et trois fois avec de l'eau pour obtenir le produit [4].

Production 27,76 g (rendement 103,2%)

P.F : 164-166°C

ccm : $Rf_3 = 0,65$

10 $[\alpha]_D^{25}$: -28,38° (c = 1, DMF)

Analyse Élémentaire (C₃₆H₄₆O₈Cl₂)

| | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|-------|
| Calculé | 54,75 | 5,87 | 14,19 |
| Trouvé | 53,37 | 5,78 | 13,43 |

15 5) PF(30-34) : Boc-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)NH₂ [5]

On ajoute 110 ml de TFA avec refroidissement à la glace à 27,76 g (35,15 mmoles) du composé [4] suspendu dans une petite quantité de chlorure de méthylène, on agite à température ambiante pendant 30 minutes et on
 20 élimine TFA sous vide. On ajoute de l'éther au résidu et on recueille par filtration les cristaux précipités, on sèche et on dissout dans 120 ml de DMF. On neutralise la solution en ajoutant 10 ml de NMM. On ajoute 12,5 g (38,67 mmoles) de Boc-Asp(OBzl)-OH et 5,22 g (38,67
 25 mmoles) de HOBt dissous dans 80 ml de DMF sec et on agite à température ambiante pendant 16 heures.

On enlève DMF sous vide et on lave le résidu avec du bi-carbonate de sodium aqueux et deux fois avec de l'eau, puis on met en suspension dans le méthanol et on ajoute du méthanol pour la recristallisation afin d'obtenir le produit [5]

Production : 31,42 g (rendement 89,8%)

P.F 214-215°C

ccm : $Rf_3 = 0,6$

$[\alpha]_D^{25}$: -23,28° (c = 1, DMF)

10 Analyse élémentaire ($C_{47}H_{57}O_{11}N_9Cl_2$)

| | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|-------|
| Calculé | 56,74 | 5,78 | 12,67 |
| Trouvé | 56,19 | 5,79 | 12,07 |

6) PF(29-34) : Boc-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)NH₂

15 [6]

On ajoute 120 ml de TFA au composé [5] (31,11 g, 31,27 mmoles) en suspension dans le chlorure de méthylène, on agite à température ambiante pendant 30 minutes et on enlève TFA et le chlorure de méthylène sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on recueille par filtration les cristaux précipités, on sèche et on dissout dans DMF sec (100 ml). On neutralise la solution avec 8 ml de NMM. On ajoute une solution de 12,64 g (34,4 mmoles) de Boc-Gln-ONP et 0,42 g (3,13 mmoles) de HOBt dissous dans DMF sec, on ajoute 3,78 ml de NMM avec refroidissement à la glace, on agite pendant 16 heures et après l'achèvement de la réaction, on soutire DMF sous vide, on lave le

résidu avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et deux fois à l'eau, on met en suspension dans le méthanol et on recristallise dans le méthanol pour obtenir le produit [6].

5 Production : 33,19 g (rendement 94,5%)

P.F : 81-83°C

ccm : $Rf_3 = 0,47$

$[\alpha]_D^{24}$: -23,98° (c=1, DMF)

Analyse élémentaire ($C_{52}H_{65}O_{13}N_{11}Cl_2$)

| 10 | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|-------|
| Calculé | 55,61 | 5,83 | 13,72 |
| Trouvé | 54,81 | 5,96 | 13,07 |

Analyse d'amino-acides : Asp 2,19 (2), Glu 1,05 (1), Val 1 (1), Tyr 0,73 (1), His 0,85 (1).

15 7) PF(27-28) : Boc-Lys(Z-Cl)-Leu-Oet [7]

On lave 97,6 g (0,2M) de Boc-Lys(Z-Cl)-OH.TBA en suspension dans 500 ml d'acétate d'éthyle avec du HCl normal et de l'eau, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on concentre sous vide pour obtenir une matière huileuse. On la dissout dans 500 ml de THF sec et on ajoute 39,14 g (0,2M) de H-Leu-Oet-Hcl et 27,0 g (0,2 M) de HOBt. On ajoute également 36,6 ml (0,2 M) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On enlève THF sous vide, on dissout le résidu dans 600 ml d'acétate d'éthyle, on lave avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, de l'eau, HCl normal et de

l'eau, dans cet ordre, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre, on concentre sous vide, on refroidit le résidu pour cristalliser la substance, on ajoute de l'hexane, on filtre et on obtient le produit [7].

5 Production : 110,62 g (rendement : 99,5%)

P.F : 77,80°C

ccm : $Rf_5 = 0,48$

$[\alpha]_D^{29}$: -9,08° (c=1, DMF)

8) PF(26-28) : Boc-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-OEt [8]

10 On ajoute 110,62 g (0,199 M) du composé [7] à 50 ml de chlorure de méthylène. On ajoute 250 ml de TFA avec refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 1 heure. On élimine sous vide TFA et le chlorure de méthylène et on obtient un composé huileux de-Boc.

15 On lave 97,1 g (0,199 M) de Boc-Lys(Z-Cl)-OH.TBA en suspension dans 500 ml d'acétate d'éthyle avec 300 ml de HCl normal et de l'eau, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on concentre sous vide pour obtenir une substance huileuse. On ajoute à cette substance huileuse
20 dissoute dans 150 ml de THF sec le composé de-Boc et HOBt (26,9 g, 0,199 M) dissous dans le THF sec (250 ml). On ajoute goutte à goutte 36,4 ml (0,199 M) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On
25 élimine THF sous vide pour précipiter des cristaux analogues à l'agar-agar, qu'on dissout dans l'acétate d'éthyle, qu'on lave avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, de

l'eau, du HCl normal et de l'eau dans cet ordre, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on concentre sous vide. On traite le précipité avec l'hexane, on filtre, on recristallise dans un mélange acétate d'éthyle/éther/hexane et on obtient le produit [8].

Production : 156,52 g (rendement : 92,2%)

P.F 114-116°C

ccm : $Rf_2 = 0,78$

$[\alpha]_D^{29}$: -20,72° (c = 1, DMF)

9) PF(25-28) : Aoc-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-OEt [9]

On ajoute 2500 ml de TFA avec refroidissement à la glace à 156,5 g (184 mmoles) du composé [8] dissous dans 50 ml de chlorure de méthylène et on agite pendant 1 heure à température ambiante, puis on concentre sous vide le mélange de réaction et on neutralise le résidu dissous dans 300 ml de DMF sec avec NMM. On ajoute 86,0 g (202 mmoles) de Aoc-Arg(Tos)-OH dissous dans 100 ml de DMF sec et 27,3g (202 mmoles) de HOBt, puis on ajoute 37,0 ml (202 mmoles) de WSC goutte à goutte à -15°C, on agite à température ambiante pendant 16 heures, on soutire DMF sous vide et on dissout le résidu dans 1 litre d'acétate d'éthyle. On lave la solution avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, une solution saturée de NaCl, deux fois avec HCl normal et une solution saturée de chlorure de sodium, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre, on concentre sous vide, on ajoute de l'éther au résidu et on filtre pour obtenir le produit [9].

Production : 217,91 g (rendement : 100,6%)

ccm : $Rf_1 = 0,09$, $Rf_2 = 0,67$

P.F : 75-78°C

$[\alpha]_D^{28} : -14,02^\circ$ (c = 1, DMF)

- 5 10) PF(24-28) : Boc-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-OEt
[10]

On ajoute 100 ml de chlorure de méthylène et 250 ml de TFA au composé [9] (217,9 g, 0,185 M), on agite à température ambiante pendant 80 minutes et on élimine sous vide le chlorure de méthylène et TFA. On dissout la matière huileuse obtenue dans 300 ml de DMF sec et on neutralise en ajoutant NMM. On ajoute 50,9 g (0,204 M) de Boc-Leu-OH-H₂O et 27,6 g (0,204 M) de HOBT dissous dans 100 ml de DMF sec et on ajoute goutte à goutte 37,3 ml (0,204 M) de WSC à -15°C, puis on agite à température ambiante pendant 16 heures, on élimine DMF sous vide et on ajoute le résidu à l'eau. On filtre le produit précipité et on recristallise deux fois dans un mélange de méthanol/éther/hexane pour obtenir le produit [10]

- 20 Production : 213,63 g (rendement : 90,5%)

P.F : 157-160°C

ccm : $Rf_1 = 0,28$, $Rf_2 = 0,77$

$[\alpha]_D^{27} = -18,68^\circ$ (c = 1 , DMF)

- 11) PF(23-28) : Boc-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)
25 -Leu-OEt [11]

On ajoute 100 ml de chlorure de méthylène et 250 ml de TFA à 153,17 g (0,12 M) du composé [10], on agite à

température ambiante pendant 80 minutes et on élimine le chlorure de méthylène et TFA sous vide. On dissout le résidu dans 250 ml de DMF sec et on neutralise à pH 7,0 en ajoutant NMM. On ajoute 17,84 g (0,132 M) de HOBt et 40,17 g (0,132 M) de Boc-Trp-OH et ensuite on ajoute 24,2 ml (0,132 M) de WSC goutte à goutte à -15°C, on agite à température ambiante pendant 16 heures, on élimine DMF sous vide et on verse le résidu dans 5 litres de bicarbonate de sodium aqueux à 5%. On filtre la substance précipitée et on la met en suspension dans l'eau pour filtration, puis on recristallise deux fois dans un mélange de méthanol et d'éther et on obtient le produit [11].

Production : 142,57 g (rendement : 81,2%)

15 P.F : 168-170°C

ccm : $Rf_1 = 0,31$, $Rf_2 = 0,82$

$[\alpha]_D^{28}$: -18,64° (c = 1, DMF)

12) PF(23-28) : Boc-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-OH [12]

20 On dissout 140,64 g (96,16 mmoles) du composé [11] dans 1200 ml d'éthanol chaud. Après refroidissement, on filtre une petite quantité du précipité, on ajoute 288 ml (3 équivalents molaires) de NaOH aqueux normal et on agite à température ambiante pendant 1 heure. On ajoute 192 ml (2 équivalents molaires) d'une solution normale de Tos.OH, on filtre et on élimine l'éthanol sous vide, on ajoute 96 ml (1 équivalent molaire) d'une

25

solution normale de Tos.OH, on ajoute 2 litres d'eau, on filtre le précipité, on sèche et on obtient le produit [12].

Production : 142,98 g (rendement : 101,1%)

5 ccm : $Rf_2 = 0,71$

P.F : 125-130°C

$[\alpha]_D^{27}$: -37,24° (c = 1, DMF)

Analyse élémentaire ($C_{69}H_{94}O_{15}N_{12}SCl_2 \cdot 2H_2O$)

| | C% | H% | N% |
|------------|-------|------|-------|
| 10 Calculé | 56,35 | 6,72 | 11,43 |
| Trouvé | 56,03 | 6,62 | 11,85 |

Analyse d'amino-acides : Leu : 2 (2), Lys 2,08 (2),

Arg 1,10 (1), Trp 0,83 (1).

13) PF(23-34) : Boc-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-

15 Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)-NH₂ [13]

On ajoute 7 ml de TFA avec refroidissement à la glace à 1,68 g (1,5 mmole) du composé [6] dissous dans un peu de chlorure de méthylène et on agite à température ambiante pendant 30 minutes. On élimine TFA sous vide,

20 on ajoute de l'éther au résidu, on filtre les cristaux précipités, on sèche, on dissout les cristaux dans 30 ml de DMF sec et on neutralise avec un peu de NMM. On ajoute 2,43 g (1,65 mmole) du composé [12], 0,22 g (1,65 mmole) de HOBt et 20 ml de DMF sec. On ajoute ensuite 0,3 ml

25 (1,1 eq. molaire) de WSC à -15°C et on agite pendant 16 heures à température ambiante. On élimine DMF sous vide,

on lave le résidu avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et deux fois avec de l'eau, on met en suspension dans du méthanol, on ajoute de l'éther, on filtre et on sèche pour obtenir le produit [13].

5 Production : 3,62 g (rendement : 99,1%)

P.F : 260-270°C

$[\alpha]_D^{25}$: -46,6° (c = 0,3, DMF)

Analyse d'acides-amino : Asp 1,94 (2), Glu 0,96 (1),

Val 0,71 (1), Leu 2,00 (2), Try 0,98 (1), Lys 2,09 (2),

10 His 0,58 (1), Arg 0,91 (1), Trp 0,78 (1).

14) PF(22) : Boc-Glu(OBzl)-OPAC [14]

On ajoute 113,5 g (0,57 mole) de bromure de phénacyle avec refroidissement à la glace à 128,2 g (0,38 M) de Boc-Glu(OBzl)-OH dissous dans 600 ml de DMF et 79,3 ml

15 (0,57 M) de Et_3N sont ajoutés goutte à goutte, puis on agite à 30°C pendant 4 heures. On ajoute 30 g d'acétate de potassium, on agite pendant 45 minutes et on élimine DMF sous vide. On ajoute 600 ml d'acétate d'éthyle au

20 aqueux à 5% et deux fois avec de l'eau. On sèche la couche d'acétate d'éthyle sur du sulfate de sodium anhydre, on élimine le solvant sous vide pour précipiter les cristaux, on ajoute de l'hexane, on filtre et on obtient le produit [14]

25 Production : 156,19 g (rendement : 90,2%)

ccm : $Rf_5 = 0,73$

15) PF(21-22) : Boc-Val-Glu(OBzl)-OPAC [15]

On ajoute 50 ml de chlorure de méthylène à 147,88 g (0,325 M) du composé [14]. On ajoute sous refroidissement 300 ml de TFA, on agite à température ambiante pendant 5 1 heure et on enlève sous vide le chlorure de méthylène et TFA. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre les cristaux précipités et on sèche. On neutralise les cristaux dissous dans DMF sec (300 ml) avec NMM à pH 7. On ajoute à la solution 35,14 g (0,26 M) de HOBt et 10 56,49 g (0,26 M) de Boc-Val-OH et on ajoute 47,6 ml (0,26 M) de WSC à -15°C, puis on agite à température ambiante pendant 2 jours. On soutire DMF sous vide, et on lave le résidu dissous dans 500 ml de chloroforme avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, de l'eau, 15 du HCl normal et de l'eau. On déshydrate la couche chloroformée en ajoutant du sulfate de sodium anhydre on élimine le solvant sous vide, on filtre les cristaux obtenus avec addition d'hexane et on recristallise dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther pour obtenir le 20 produit [15].

Production : 106,97 g (rendement : 74,2%)

ccm : $Rf_3 = 0,63$

P.F : 139-141°C

$[\alpha]_D^{29}$: -18,92 (C : 1 , DMF)

16) PF(20-22) : Aoc-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-OPAC [16]

On ajoute 50 ml de chlorure de méthylène à 99,93 g (0,18 M) du produit [15]. On ajoute 200 ml de TFA avec refroidissement à la glace, on agite à température ambiante pendant 1 heure et on soutire sous vide le chlorure de méthylène et TFA. On ajoute de l'hexane au résidu, on enlève le solvant par décantation, on ajoute de l'éther, puis on élimine l'éther sous vide. On neutralise la matière huileuse obtenue dissoute dans 200 ml de DMF sec avec NMM.

On ajoute 24,33 g (0,18 M) de HOBt, 66,60 g (0,18 M) de Aoc-Arg(Tos)-OH et 200 ml de DMF sec et ensuite on ajoute 32,94 ml (0,18 mole) de WSC à -15°C, on agite à température ambiante pendant 16 heures, on soutire le DMF sous vide et on dissout le résidu dans 1 litre d'acétate d'éthyle. On lave la solution avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, de l'eau, du HCl normal et de l'eau, dans cet ordre, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre, puis on élimine sous vide l'acétate d'éthyle. On recristallise la substance huileuse obtenue dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther et on met les cristaux en suspension. On répète la même opération trois fois pour obtenir le produit [16].

Production : 149,75 g (rendement : 94,6%)

ccm : $Rf_1 = 0,74$, $Rf_4 = 0,81$

P.F : 110-114°C

$[\alpha]_D^{29}$: -11,5° (c = 1 , DMF)

17) PF(19-22) : Boc-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-OPAC
[17]

On ajoute 50 ml de chlorure de méthylène à 149,40g
(0,170 mole) du composé [16]. On ajoute 300 ml de TFA avec
5 refroidissement à la glace, on agite à température ambiante
pendant 1 heure et on élimine sous vide le chlorure de
méthylène et TFA. On ajoute de l'éther au résidu, on éli-
mine l'éther sous vide et on dissout la matière huileuse
obtenue dans 200 ml de DMF sec. On ajoute 25,27 g (0,187 M)
10 de HOBt et 63,09 g (0,187 M) de Boc-Glu(OBzl)-OH, puis on
ajoute 100 ml de DMF sec et 34,22 ml de WSC (0,187 M) à
-15°C, puis on agite à température ambiante pendant 16
heures, on élimine les solvants et on verse le résidu dans
6 litres d'eau, puis on recueille par filtration les
15 cristaux précipités. On filtre les cristaux suspendus dans
le méthanol et l'éther et on dissout dans du méthanol
chaud. On filtre le précipité après refroidissement et on
met de nouveau en suspension dans le méthanol. On répète
les mêmes opérations trois fois et on obtient le composé
20 [17]. On élimine le solvant de la liqueur-mère et on re-
cristallise dans un mélange de méthanol et d'éther pour
obtenir 25,02 g du produit.

Production : 141,44 g (rendement : 76,7%)

ccm : $Rf_1 = 0,56$, $Rf_4 = 0,82$

25 P.F : 119-121°C

$[\alpha]_D^{29}$: -12,9° (c = 1, DMF)

18) PF(18-22) : Boc-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-
OPAC [18]

On ajoute du chlorure de méthylène et TFA (24 ml) à
6,51 g (6 mmoles) du composé [17] avec refroidissement à
5 la glace, on agite à température ambiante pendant 40 minu-
tes, on élimine sous vide le chlorure de méthylène et
TFA, on ajoute de l'éther au résidu pour cristallisa-
tion et on sèche. On dissout les cristaux dans DMF sec
et on neutralise à pH 7 par addition de NMM avec refroi-
10 dissement à la glace. On ajoute 1,67 g (7,2 mmoles) de
Boc-Nle-OH et 0,97 g (7,2 mmoles) de HOBt dissous dans
40 ml de DMF sec, puis on ajoute 1,3 ml (7,2 mmoles) de
WSC à -15°C, on agite pendant 16 heures, on élimine DMF
sous vide, on ajoute de l'eau au résidu, on filtre le
15 précipité, et on lave avec du bicarbonate de sodium
aqueux à 5%, trois fois avec de l'eau, trois fois avec
HCl normal et du méthanol. On recristallise le produit
[18] dans un mélange de méthanol et d'éther.

Production : 5,61 g (rendement : 78%)

20 ccm : $R_f_1 = 0,56$

19) PF(18-22) : Boc-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-OH
[19]

On ajoute 8 g de poudre de zinc à 5,03 g (4,2 mmoles)
du composé [18] dissous dans 30 ml d'acide acétique et on
25 agite à température ambiante pendant 5,5 heures. On filtre
la poudre de zinc et on élimine sous vide l'acide acétique.
On mélange à l'éther les cristaux précipités, on filtre

pour obtenir le produit [19]

Production : 4,42 g

ccm : $Rf_1 = 0,18$, $Rf_2 = 0,67$

P. F : 210°C (déc)

- 5 Analyse d'amino-acides : Nle 1,01 (1), Glu 2,05 (2),
Arg 0,98 (1) , Val 1 (1)

20) PF(18-34) : Boc-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-
Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-
Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)NH₂ [20]

- 10 On ajoute 0,5 g (3,5 mmoles) de Skatole, 25 ml de
sulfure de diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de
TFA au composé [19] (8,9 g, 3,5 mmoles), on agite à 0°C
pendant 10 minutes et à température ambiante pendant 45
minutes, puis on concentre sous vide le mélange de réaction,
15 on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on
sèche, on dissout dans DMF sec (100 ml) et on neutralise
avec NMM à pH 7. On ajoute 0,54 g (4 mmoles) de HOBt
et 4,3 g (4 mmoles) du composé [19]. On ajoute 0,73 ml de
WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant
20 2 jours. On distille DMF sous vide et on ajoute du bi-
carbonate de sodium aqueux à 5%. On filtre le précipité
et on lave à l'eau. On dissout le produit dans l'éthanol
et on précipite par addition d'éther. On répète deux fois
les mêmes opérations pour obtenir le produit [20].

- 25 Production : 11,12 g (rendement 94%)

ccm : $Rf_3 = 0,72$

P.F : 250°C (déc)

$[\alpha]_D^{28}$: $-4,73^\circ$ ($c = 0,53$, DMF)

Analyse d'acides-amino : Asp 1,98 (2) ; Glu 3,04 (3) ;
Val 1,69 (2) ; Leu 2 (2) ; Tyr 1,07 (1) ; Lys 1,93 (2) ;
His 0,59 (1) ; Arg 1,97 (2) ; Trp 0,35 (1) ; Nle 1,07 (1).

5 21) PF(17) : Bos-Ser(Bzl)-OPAC [21]

On ajoute 89,6 g (0,45 M) de bromure de phénacyle
à 88,6 g (0,3 M) de Boc-Ser(Bzl)-OH dissous dans 400 ml
de DMF et on ajoute goutte à goutte avec refroidissement
à la glace 62,6 ml (0,45 M) de Et_3N , puis on agite à 30°C
10 pendant 3,5 heures, on ajoute 22,1 g (0,225 M) d'acétate
de potassium et on agite à température ambiante pendant
1 heure. On distille DMF sous vide et on dissout le résidu
dans 500 ml d'acétate d'éthyle, puis on lave la solution
avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et de l'eau.

15 Après séchage de la couche d'acétate d'éthyle sur du sul-
fate de sodium anhydre, on élimine le solvant sous vide.
On place le résidu dans un réfrigérateur pour cristalli-
ser et on ajoute de l'hexane pour obtenir le produit [21].

Production : 122,97 g (rendement 99,1)

20 ccm : $Rf_5 = 0,82$

$[\alpha]_D^{29,5}$: $-11,88^\circ$ ($c = 1,0$, DMF)

P.F : $45-47^\circ\text{C}$.

22) PF(16-17) : Boc-Asn-Ser(Bzl)-OPAC [22]

On ajoute 50 ml de chlorure de méthylène à 119,9 g (0,29 M) du composé [21], on ajoute 250 ml de TFA avec refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 1 heure. Une fois la réaction terminée, on concentre le mélange de réaction sous vide, on ajoute de l'éther et on recueille par filtration et on sèche les cristaux précipités. On dissout les cristaux dans 400 ml de DMF sec et on neutralise à pH 7 avec NMM. On ajoute 31,35 g (0,232 M) de HOBT et 53,88 g (0,232 M) de Boc-Asn-OH et ensuite on ajoute goutte à goutte 42,46 ml (0,232 M) de WSC, on agite à température ambiante pendant 16 heures, puis on élimine sous vide DMF. On lave le résidu dissous dans 500 ml d'acétate d'éthyle avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%. On lave les cristaux précipités avec de l'eau et de l'éther pour obtenir 41,79 g des cristaux I du produit [22]. On concentre la couche d'acétate d'éthyle du filtrat sous vide et on obtient une matière huileuse résiduelle qu'on recristallise dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther pour obtenir 6,22 g de cristaux II du produit [22].

Production : 48,01 g (rendement : 39,2%)

ccm : $Rf_2 = 0,61$, $Rf_4 = 0,62$

P.F : 174-176°C

$[\alpha]_D^{29,5} : -5,54^\circ$ (c = 1,0, DMF)

Analyse des amino-acides : Asp 1,22 (1) , Ser 1,00 (1)

23) PF(15-17) : Boc-Leu-Asn-Ser(Bzl)-OPAC [23]

On ajoute 50 ml de chlorure de méthylène à 80,91 g (0,153 M) du composé [22] et 150 ml de TFA avec refroidissement à la glace, puis on agite à température ambiante pendant 1 heure. On concentre sous vide le mélange de réaction, on ajoute de l'éther au résidu, on sépare par décantation la matière huileuse formée, on dissout dans 150 ml de DMF sec et on neutralise avec NMM à pH 7. On ajoute 22,7 g (0,168 M) de HOBt, 41,9 g (0,168 M) de Boc-Leu-OH.H₂O et 100 ml de DMF, puis on ajoute goutte à goutte 30,7 ml (0,168 M) de WSC à -15°C, on agite à température ambiante et quand le mélange de réaction est gélifié, on le place pendant 3 jours dans un caisson à glace et on ajoute de l'eau. On recueille le précipité par filtration et on lave avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et de l'eau, puis on sèche pour obtenir le produit [23].

Production : 88,52 g (rendement : 90,3%)

ccm : Rf₂ = 0,80 , Rf₃ = 0,88

P.F : 192-193°C

Analyse élémentaire (C₃₃H₄₄O₉N₄)

| | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|------|
| Calculé | 61,86 | 6,92 | 8,75 |
| Trouvé | 61,81 | 7,05 | 8,56 |

24) PF(14-17) : Boc-His(Tos)-Leu-Asn-Ser(Bzl)-OPAC [24]

On ajoute 100 ml de chlorure de méthylène à 87,55 g (0,137 M) du composé [23]. On ajoute 200 ml de TFA avec

refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 70 minutes. On concentre sous vide le mélange de réaction, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 200 ml de DMF sec et on neutralise à pH 7 en ajoutant NMM pour obtenir une solution du composé de-Boc.

On met en suspension dans 1 litre d'acétate d'éthyle 89,2 g (0,151 M) de Boc-His(Tos)-OH.DCHA et on lave avec 500 ml d'acide sulfurique normal puis on filtre les cristaux précipités. On lave à l'eau la couche d'acétate d'éthyle, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on distille le solvant sous vide. On ajoute les matières huileuses obtenues dissoutes dans 150 ml de DMF sec et 20,4 g (0,151 M) de HOBT à la solution du composé de-Boc. On ajoute 27,6 ml (0,151 M) de WSC goutte à goutte à -15°C et on agite à température ambiante pendant 3 jours. On distille le solvant sous vide. On ajoute de l'eau au résidu, on filtre le précipité, on lave avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et de l'eau, on sèche et on obtient le produit [24].

Production : 108,63 g (rendement : 85,1%)

ccm : $Rf_2 = 0,20$, $0,79$, $Rf_3 = 0,55$, $0,87$ (on obtient partiellement le composé de-Tos)

P.F : $154-156^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{29,5} : -18,58^{\circ}$ ($c = 1,0$, DMF)

25) PF(13-17) : Boc-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-OPAC [25]

On ajoute 100 ml de chlorure de méthylène à 107,96 g (0,116 mole) du composé [24], on ajoute 100 ml de TFA avec refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 70 minutes. On concentre sous vide le mélange de réaction, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 200 ml de DMF sec et on neutralise à pH 7 avec NMM pour obtenir une solution de-Boc.

10 On lave 62,46 g (0,128 M) de Boc-Lys(Z-Cl)-OH.TBA en suspension dans 600 ml d'acétate d'éthyle avec du HCl normal et de l'eau. On sèche la couche d'acétate d'éthyle avec du sulfate de sodium anhydre et on distille le solvant sous vide. On dissout dans 100 ml de DMF sec la substance huileuse obtenue et 17,30 g (0,128 M) de HOBt. On ajoute 15 une solution de celui-ci- à la solution de-Boc ci-dessus. On ajoute goutte à goutte 24,42 ml (0,128 M) de WSC et on agite pendant 16 heures à température ambiante. On élimine le solvant sous vide et on ajoute le résidu à 5 litres de bicarbonate de sodium aqueux à 3%, puis on lave les cristaux précipités avec de l'eau et on sèche. On ajoute de 20 l'éther à la solution méthanolique des cristaux pour précipiter et on met en suspension le précipité dans l'acétate d'éthyle et on filtre. On répète les mêmes opérations à trois reprises pour obtenir le produit [25].

Production : 114,42 g (rendement : 91,8%)

ccm : Rf2 = 0,34 , Rf3 = 0,68

P.F : 200-202°C

$[\alpha]_D^{28}$: -26,94° (c = 1,0 , DMF)

26) PF(13-17) : Boc-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-OH [26]

On ajoute 150 g de poudre de zinc à 86,0 g (80 mmoles)
 5 du composé [25] dissous dans 500 ml d'acide acétique, on agite à température ambiante pendant 5 heures, on filtre pour enlever la poudre de zinc, on concentre le filtrat sous vide, on ajoute de l'éther au résidu et on filtre les cristaux précipités pour obtenir le produit [26].

10 Production : 84,70 g (rendement 95,2%)

ccm : $Rf_2 = 0,47$

P.F : 240-250°C

$[\alpha]_D^{30}$: -19,16° (c = 1,0 , DMF)

Analyse élémentaire ($C_{45}H_{52}O_{12}N_9Cl \cdot 2CH_3COOH \cdot 2H_2O$) :

| 15 | C% | H% | N% |
|---------|-------|------|-------|
| Calculé | 53,76 | 6,63 | 11,52 |
| Trouvé | 52,83 | 6,36 | 11,35 |

Analyse des amino-acides : Asp 1,01 (1), Ser 0,83 (1) ,
 Leu 1 (1), Lys 0,93 (1) His 0,97 (1)

27) PF(13-34): Boc-Lys(Z-Cl)

-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Nle-

Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Glu-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)-NH₂ (27)

On ajoute 0,46 g (3,2 mmoles) de Skatole, 25 ml de sulfure de diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de TFA à 10,77 g (3,2 mmoles) du composé [20], on agite à 0°C pendant 10 minutes et à température ambiante pendant 5 60 minutes, on concentre le mélange de réaction sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 100 ml de DMF sec et on neutralise à pH 7 avec NMM. On ajoute 0,51 g (3,8 mmoles) de HOBt et 4,23 g (3,8 mmoles) du composé [26]. On ajoute 10 0,70 ml de WSC à -15°C et on agite à température ambiante. On élimine DMF sous vide, on ajoute de l'eau au résidu, on filtre le précipité, on lave à l'eau et on sèche pour obtenir le produit [27].

Production :

15 13,60 g (rendement 100%)

P.F : 133-160,5°C

Analyse des amino-acides : Asp 2,96 (3) , Ser 0,62 (1),
Glu 3,02 (3) , Val 1,72 (2), Leu 3 (3), Tyr 1,06 (1) ,
Lys 3,01 (3) , His 1,43 (2), Arg 1,98 (2) , Trp 0,60 (1),
20 Nle 1,06 (1).

28) PF(11-12) : Boc-Leu-Gly-OBzl [28]

On ajoute 50 ml de benzène sec à 4,99 g (20 mmoles) de Boc-Leu-OH.H₂O dissous dans 30 ml de THF sec et on distille le solvant par voie azéotropique. On dissout la 25 matière huileuse obtenue dans 70 ml de THF sec. On ajoute 20 mmoles de H-Gly-OBzl.TosOH et 2,7 g (20 mmoles) de HOBt et on ajoute 5 ml de WSC à -5°C puis on agite à tempé-

rature ambiante pendant 16 heures. On distille le solvant sous vide et on dissout le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle, on lave la solution deux fois avec du HCl normal, deux fois avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et
5 deux fois à l'eau. On sèche la couche d'acétate d'éthyle en ajoutant du sulfate de sodium anhydre et on concentre sous vide pour obtenir un produit huileux [28].

29) PF(10-12) : Boc-Asn-Leu-Gly-OBzl [29]

On ajoute 40 ml d'une solution d'acide chlorhydrique
10 (4,39 N) et de dioxane au produit huileux [28] à -15°C , on agite pendant 90 minutes, on concentre sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on recueille par filtration le précipité, on sèche et on dissout dans 30 ml de DMF sec. On ajoute Et_3N à -5°C pour régler le pH à 7 et on ajoute
15 0,3 g (2,2 mmoles) de HOBt et 7,77 g (22 mmoles) de Boc-Asn-ONP, puis on agite à température ambiante pendant 3 jours. On ajoute de l'eau au mélange de réaction, on extrait le précipité avec 200 ml de chloroforme, on lave la couche chloroformée avec du HCl normal, du bicarbonate de sodium
20 aqueux à 5% et de l'eau, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre, on concentre sous vide pour chasser le solvant, on recristallise le résidu dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane et on obtient le produit [29].

Production : 8,0 g (rendement 73,8%)

25 P.F 152-156°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$: $-36,1^{\circ}$ ($c = 1,0$, DMF)

30) PF(9-12) : Boc-His-Asn-Leu-Gly-OBzl [30]

On ajoute 5 ml de chlorure de méthylène à 7,36 g (15,5 mmoles) du composé [29], on ajoute 32 ml de TFA avec refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 60 minutes. On concentre le mélange de réaction sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on recueille le précipité par filtration, on sèche, on dissout dans 40 ml de DMF sec et on neutralise à pH 7 avec NMM pour obtenir une solution de-Boc.

On ajoute 150 ml d'acétate d'éthyle et 90 ml d'acide sulfurique 0,5N à 10,99 g (18,6 mmoles) de Boc-His(Tos)-OH.DCHA et on secoue. On lave à trois reprises la couche d'acétate d'éthyle avec de l'eau, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre, on distille l'acétate d'éthyle sous vide et on obtient une substance huileuse. On dissout cette substance et 2,5 g (18,6 mmoles) de HOBt dans 60 ml de DMF sec. On ajoute la solution à la solution de de-Boc, on ajoute 3,4 ml (18,6 mmoles) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On distille le solvant sous vide, on dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle, on lave trois fois avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et deux fois avec de l'eau, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on distille le solvant sous vide. On ajoute de l'éther au résidu et on recueille par filtration les cristaux précipités. Dans ces cristaux, Tos de His est partiellement éliminé et pour éliminer entièrement Tos on doit dissoudre les cristaux dans 100 ml

de DMF, ajouter 7,05 g de HOBt et agiter le mélange à température ambiante pendant 3 jours. On élimine DMF sous vide, on dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle, on lave deux fois avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et de l'eau, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre puis on distille le solvant sous vide. On ajoute de l'éther aux cristaux et on filtre pour obtenir le produit [30].

Production : 7,32 g (rendement 74,8%)

ccm : $Rf_2 = 0,1$

10 31) PF(8-12) : Boc-Nle-His-Asn-Leu-Gly-OBzl [31]

On ajoute 5 ml de chlorure de méthylène à 7,32 g (11,6 mmoles) du composé [30]. on ajoute 30 ml de TFA avec refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 40 minutes. On concentre le mélange de réaction sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 40 ml de DMF sec et on règle à pH 7 en ajoutant NMM. On ajoute 1,9 g (13,92 mmoles) de HOBt et 3,23 g (13,92 mmoles) de Boc-Nle-OH dissous dans le DMF sec, et on ajoute 2,5 ml

20 (13,92 mmoles) de WSC, puis on agite le mélange de réaction à température ambiante pendant 16 heures, on chasse le solvant sous vide, on ajoute de l'eau au résidu, on filtre le précipité, on lave avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, deux fois avec HCl normal et trois fois à l'eau et
25 on sèche pour obtenir le produit [31]

Production : 3,70 g (rendement 42,9%)

ccm : $Rf_2 = 0,20$

32) PF(8-12) Boc-Nle-His-Asn-Leu-Gly-OH [32]

On ajoute 300 mg de 10% Pd/C à 2,8 g (3,8 mmoles) du composé [31] dissous dans 100 ml d'éthanol et on fait passer pendant 3 heures de l'hydrogène gazeux à température ambiante. On filtre les matières insolubles précipitées dans le mélange de réaction, on lave avec DMF et on concentre le filtrat sous vide. On ajoute au résidu un mélange d'éthanol et d'éther et on recueille le précipité par filtration et on sèche pour obtenir le produit [32].

10 Production : 1,76 g (rendement 71,1%)

P.F 112,5°C

ccm : $R_f_2 = 0,05$

Analyse d'acides aminés : Asp 0,96 (1), Gly 0,98 (1), Leu 1 (1), Lys 0,95 (1), Nle 0,94 (1).

33) PF(8-34):

Boc-Nle-His-Asn

-Leu-Gly-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)-NH₂

(33)

- On ajoute 0,33 g (2,5 mmoles) de Skatole, 25 ml de sulfure de diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de TFA à 10,60 g (2,5 mmoles) du composé [27], on agite à 0°C pendant 10 minutes et à la température ambiante pendant 50 minutes et on concentre sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 100 ml de DMF et on ajoute NMM avec refroidissement à la glace pour régler le pH à 7. On ajoute 0,36 g (2,7 mmoles) de HOBt et 1,76 g (2,7 mmoles) du composé [32] à la solution et on ajoute 0,5 ml de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On filtre le précipité, on lave à l'eau, on sèche et on reprécipite dans un mélange d'éthanol et d'éther pour obtenir le produit [33].
- 15 Production : 10,94 g (rendement 91,7%)
P.F : 140,5-162°C.

$$[\alpha]_D^{28} = 1,94 (C = 0,52, DMF)$$

Analyse d'acides-amino : Asp 3,87 (4), Ser 0,76 (1),

Glu 3,34 (3), Gly 0,77 (1), Val 1,84 (2),

Leu 4 (4), Tyr 1,04 (1), Lys 3,28 (3), His

2,37 (3), Arg 2,14 (2), Trp 0,73 (1), Nle

2,07 (2).

34) PF(7) : Boc-Leu-OPAC [34]

On ajoute goutte à goutte 12,5 ml (90 mmoles) de Et_3N à 15,0 g (70 mmoles) de Boc-Leu-OH. H_2O et 17,9 g (90 mmoles) de bromure de phénacyle dissous dans 100 ml de DMF, on agite à 30°C pendant 2 heures, on ajoute 4,42 g (45 mmoles) d'acétate de potassium, on agite à température ambiante pendant 45 minutes et on distille DMF. On lave le résidu dissous dans l'acétate d'éthyle à deux reprises avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et à deux reprises avec de l'eau, on sèche la couche d'acétate d'éthyle sur du sulfate de sodium anhydre et on distille le solvant sous vide. On place le résidu dans un caisson à glace et on sèche les cristaux précipités pour obtenir le produit [34].

15 Production : 21,23 g (rendement 100%)

ccm : $R_f = 0,89$

35) PF(6-7) : Boc-Gln-Leu-OPAC [35]

On ajoute 20 ml de chlorure de méthylène à 20,96 g (60 mmoles) du composé [34], on ajoute 30 ml de TFA avec refroidissement à la glace, on agite à température ambiante pendant 40 minutes et on concentre le mélange de réaction sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 70 ml de DMF sec et on règle le pH à 7 en ajoutant NMM avec refroidissement à la glace. On ajoute à la solution 8,1 g (60 mmoles) de HOBt et 14,78 g (60 mmoles) de Boc-Gln-OH dissous dans 90 ml de DMF sec, puis on ajoute 10,9 ml (60 mmoles) de WSC

- à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On élimine DMF sous vide, on dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle et on lave deux fois avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, deux fois avec du HCl normal et trois fois avec de l'eau. On sèche la couche d'acétate d'éthyle sur du sulfate de sodium anhydre, on distille le solvant sous vide, on ajoute de l'hexane aux cristaux précipités, on filtre et on sèche pour obtenir le produit [35].
- 10 Production : 17,25 g (rendement 60,2%)
ccm: $R_f = 0,38$
36) PF(5-7) Boc-Ile-Gln-Leu-OPAC [36]
- On ajoute 10 ml de chlorure de méthylène au composé [35] (17,19 g, 36 mmoles), on ajoute 70 ml de TFA avec refroidissement à la glace, on agite à température ambiante pendant 60 minutes et on concentre le mélange sous vide. On sèche le résidu sous vide, on dissout dans 130 ml de DMF sec et on règle le pH à 7 avec refroidissement à la glace en ajoutant NMM. On ajoute goutte à goutte à la solution 5,3 g (39,6 mmoles) de HOBT et 9,5 g (39,6 mmoles) de Boc-Ile-OH. $0,5\text{H}_2\text{O}$ et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On distille DMF sous vide, on ajoute au résidu du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, on filtre le précipité, on lave avec du bicarbonate de sodium à 5% deux fois avec HCl normal et trois fois avec de l'eau et on sèche. Le précipité est resédimenté à partir d'un mélange d'éthanol et d'éther pour obtenir le produit [36].

Production : 16,35 g (rendement : 76,9%)

ccm : $Rf_1 = 0,41$, $Rf_2 = 0,68$

37) PF(4-7) : Boc-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-OPAC [37]

On ajoute 10 ml de chlorure de méthylène à 16,24 g
5 (27,5 mmoles) du composé [36]. On ajoute à la solution 70
ml de TFA, on agite à température ambiante pendant 60
minutes et on concentre le mélange de réaction sous vide.
On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité,
on sèche, on dissout dans 100 ml de DMF et on règle le
10 pH à 7 en ajoutant NMM sous refroidissement à la glace.
On ajoute à la solution 4,09 g (30,25 mmoles) de HOBt et
10,2 g (30,25 mmoles) de Boc-Glu(OBzl)-OH dissous dans
50 ml de DMF sec, on ajoute goutte à goutte 5,5 ml de
WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant
15 16 heures. On distille le DMF sous vide et on ajoute au
résidu du bicarbonate de sodium aqueux à 5%. On filtre
le précipité formé, on lave avec du bicarbonate de sodium
aqueux à 5%, deux fois avec HCl normal et quatre fois
avec de l'eau, puis on sèche. On obtient le produit [37]
20 par reprécipitation dans un mélange d'éthanol et d'éther.
Production : 21,68 g (rendement 97,1%)

ccm : $Rf_1 = 0,52$

38) PF(3-7) : Boc-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-OPAC [38]

On ajoute 10 ml de chlorure de méthylène à 21,46 g
25 (26,5 mmoles) du composé [37], on ajoute 90 ml de TFA
sous refroidissement à la glace, on agite à température
ambiante et on concentre le mélange de réaction sous vide.

On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 150 ml de DMF sec et on règle le pH à 7 en ajoutant NMM sous refroidissement à la glace. On ajoute à la solution 3,9 g (29,15 mmoles) de HOBt et
5 8,6 g (29,15 mmoles) de Boc-Ser(Bzl)-OH dissous dans 50 ml de DMF sec. On ajoute 5,3 ml (29,15 mmoles) de WSC et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On distille le DMF sous vide et on ajoute au résidu du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, puis on filtre le précipité.
10 On lave le précipité avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, deux fois avec HCl normal et quatre fois avec de l'eau, on met en suspension dans l'éther et on filtre pour obtenir le produit [38].

Production : 24,8 g (rendement : 94,7%)

15 ccm : $R_f_1 = 0,53$

39) PF(2-7) : Boc-Val-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-OPAC [39]

On ajoute 20 ml de chlorure de méthylène à 24,68 g (25 mmoles) du composé [38], on ajoute 100 ml de TFA sous
20 refroidissement à la glace et on agite à température ambiante pendant 50 minutes. On concentre le mélange de réaction sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité et on sèche. On dissout le précipité séché dans 120 ml de DMF sec et on règle la solution à pH 7
25 en ajoutant du NMM sous refroidissement à la glace. On ajoute à la solution 4,05 g (30 mmoles) de HOBt et 6,5 g (30 mmoles) de Boc-Val-OH dissous dans 80 ml de DMF sec,

on ajoute goutte à goutte 5,5 ml (30 mmoles) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On filtre le précipité formé après avoir ajouté de l'eau et on lave deux fois avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%,
5 deux fois avec HCl normal et quatre fois avec de l'eau, on met en suspension dans l'éther et on filtre pour obtenir le produit [39].

Production : 26,32 g (rendement 96,8%)

ccm : $R_f_1 = 0,49$

10 40) PF(1-7): Boc-Ser(Bzl)-Val-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-OPAC [40]

On ajoute 20 ml de chlorure de méthylène à 26,07 g (24 mmoles) du composé [39]. On ajoute 100 ml de TFA et on agite à température ambiante pendant 40 minutes. On
15 concentre le mélange de réaction sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, et on dissout dans 100 ml de DMF sec. On règle le pH à 7 en ajoutant NMM. On ajoute 3,9 g (28,8 mmoles) de HOBt et 8,5 g (28,8 mmoles) de Boc-Ser(Bzl)-OH dissous dans 50 ml
20 de DMF sec, puis on ajoute 5,3 ml (28,8 mmoles) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. Le précipité se forme dans le mélange de réaction et on lui ajoute de l'eau. On filtre le précipité, on lave avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, du HCl normal et de
25 l'eau, on met en suspension dans l'éther et on filtre. On répète la même opération deux fois pour obtenir le produit [40].

Production : 28,0 g (rendement : 92,3%)

ccm : $Rf_1 = 0,53$

41) PF(1-7) : Boc-Ser(Bzl)-Val-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-OH [41]

- 5 On ajoute 15 g de poudre de zinc à 12,6g (10 mmoles) du composé [40] dissous dans l'acide acétique (300 ml) et on agite à 50°C pendant 4 heures, on filtre ensuite la poudre de zinc. On distille l'acide acétique sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on recueille les cristaux
- 10 précipités et on lave pour obtenir le produit [41].

Production : 11,15 g (rendement : 97,4%)

P.F : 260°C (déc)

ccm : $Rf_1 = 0,14$, $Rf_2 = 0,64$

Analyse des amino-acides : Ser 1,81 (2), Glu 2,02 (2)

- 15 Val 0,95 (1), Leu 1 (1), Ile 0,92 (1).

42) Protégé - [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] - h - P T H (/ - 3 4) NH₂ ; Boc-Ser(Bzl)-Val-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Tyr(Bzl-Cl₂)-NH₂ [42]

- On ajoute 0,30 g (2,28 mmoles) de Skatole, 25 ml de sulfure de diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de TFA, à 10,86 g (2,28 mmoles) du composé [33] sous refroidissement à la glace, on agite à température ambiante pendant 60 minutes et on concentre sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche et on dissout dans un mélange de 100 ml de DMF sec et 10 ml de DMSO et on règle à pH 7 en ajoutant NMM sous refroidissement à la glace. On ajoute 0,37 g (2,74 mmoles) et 3,14 g (2,74 mmoles) du composé [41], on ajoute 0,50 ml (2,74 mmoles) de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On ajoute de l'eau au mélange de réaction, on filtre le précipité et on lave avec de l'eau et un mélange éthanol-éther pour obtenir le produit [42].
- 15 Production : 12,87 g (rendement : 97,3%)
P.F : 139,5-175°C

$$[\alpha]_D^{28} = -1,97^\circ (C = 0,5 / \text{DMF})$$

Analyse d'acides-amino: Asp 3,72 (4), Ser 2,76 (3),

Glu 5,58 (5), Gly 0,69 (1), Val 2,86 (3),

Ile 1,11 (1), Leu 5 (5), Tyr 0,99 (1), Lys

2,87 (3), His 2,19 (3), Arg 2,06 (2), Trp

0,65 (1), Nle 1,96 (2)

43) [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂

On ajoute 3,5 ml d'anisole, 0,35 ml d'éthanedithiol, 3,5 ml de sulfure de diméthyle et 35 ml de HF anhydre à 2,9 g (0,5 mmole) du composé [42] et on agite pendant 5 60 minutes. On distille HF sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on recueille le précipité et on dissout dans l'acide acétique au dixième. On fait passer la solution à travers une colonne (3,5 x 12 cm) de Dowex X1 (type acétate, marque déposée) et on recueille les 10 fractions positives à la ninhydrine et on lyophilise pour obtenir 1,87 g de produit brut. Ce produit dissous dans 50 ml d'acide acétique au dixième est alors chargé sur une colonne (2 x 33 cm) de CM-cellulose et on élue par une élution à gradient linéaire d'acétate d'ammonium 15 0,05 M (pH 5,1, 1 litre) -acétate d'ammonium 0,4 M (pH 6,0, 1 litre). Chaque fraction de 9,0 ml donnant environ $R_{f_6} = 0,30$, on recueille les fractions n° 74 à 84 et on lyophilise. On dissout la matière lyophilisée dans une petite quantité de HCl au dixième et on charge 20 la solution sur une colonne (3 x 115 cm) de Sephadex G-25 et on élue avec l'acide acétique au dixième. On contrôle chaque fraction par son pouvoir absorbant à 280 nm et on recueille les fractions ayant un pic majeur et on lyophilise pour obtenir [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂.

25 Production : 140 mg

ccm : $R_{f_6} = 0,30$

Analyse des amino-acides (hydrolysés par HCl hexanormal

contenant 3% d'acide thioglycolique) :

Asp 3,98 (4), Ser 2,10 (3), Glu 4,93 (5), Gly 0,97 (1),
Val 2,66 (3), Ile 0,87 (1), Leu 5,00 (5), Tyr 1,11 (1),
Lys 3,26 (3), His 2,30 (2), Arg 2,03 (2), Trp 0,62 (1),
5 Nle 2,22 (2).

CLHP : colonne ; nucléosile 5C18 (4 mm DI x 150 mm)

tampon : acétonitrile à 0,1% d'acide acétique contenant
un phosphate 0,1 M (le rapport d'acétonitrile est le
gradient linéaire déterminé à 20% pour les cinq premières
10 minutes et de 20 à 40% pour les vingt minutes suivantes)
débit : 1 ml /min.

détection : 225 nm

résultat : pic unique à 19,07 min.

Exemple 2

15 [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34)NH₂ :

44) PF(23-34) : Boc-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-
Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ [43]

On met en suspension 1,68 g de Z(OMe)-Gln-Asp(OBzl)-
Val-His-Asn-Phe-NH₂ préparé selon un procédé d'un brevet
20 japonais non examiné et publié n°55-113753 dans une
petite quantité de chlorure de méthylène. On ajoute 7 ml
de TFA avec refroidissement à la glace et on agite à
température ambiante pendant 30 minutes. On distille
TFA sous vide, on ajoute de l'éther au résidu, on filtre
25 les cristaux précipités et on sèche. On neutralise les
cristaux dissous dans 30 ml de DMF sec avec une petite
quantité de NMM. On ajoute le composé [12] de l'exemple 1
(2,43 g), HOBt (0,22 g) et DMF sec (20 ml) ainsi que

WSC (0,3 ml , 1,1 eq molaire) à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On distille DMF sous vide. On lave le résidu avec du bicarbonate de sodium aqueux à 5% et deux fois avec de l'eau, on met en suspension dans du méthanol, on ajoute de l'éther, on filtre et on sèche pour obtenir le produit [43].

Production 3,62 g

P.F : 262-271°C

$[\alpha]_D^{25}$: -4,51 (c = 0,3 , DMF)

10 Analyse des amino-acides : Asp 1,94 (2), Glu 0,96 (1), Val 0,71 (1), Leu 2,00 (2), Phe 0,98 (1), Lys 2,09 (2), His 0,58 (1), Arg 0,91 (1), Trp 0,78 (1).

45) PF(18-34) : Boc-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-

15 Val-His-Asn-Phe-NH₂ [44]

On ajoute 0,5 g (3,5 mmoles) de Skatole, 25 ml de sulfure de diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de TFA au composé [13] préparé comme dans l'exemple 1 (3,9 g 3,5 mmoles), on agite à 0°C pendant 10 minutes et à température ambiante pendant 45 minutes et on concentre le mélange de réaction sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 100 ml de DMF et on neutralise à pH 7 avec NMM. On ajoute 0,54 g de HOBtet 4,3 g du composé [43] puis 0,73 ml de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 2 jours. On distille DMF sous vide. On ajoute au résidu du bicarbonate de sodium aqueux à 5%, on filtre le précipité et on lave à l'eau. On dissout le produit dans

l'éthanol et on ajoute de l'éther pour la précipitation. On répète la même opération deux fois pour obtenir le produit [44].

Production : 11,12 g (rendement 95,6%)

5 ccm : $Rf_3 = 0,73$

P.F : 252°C (déc)

$[\alpha]_D^{28}$: -4,81° (c : 0,53, DMF)

Analyse des amino-acides : Asp 1,98 (2), Glu 3,04 (3),

Val 1,69 (2), Leu 2 (2), Phe 1,07 (1), Lys 1,93 (2),

10 His 0,59 (1), Arg 1,97 (2), Trp 0,35 (1), Nle 1,07 (1):

46) PF(13-34) : Boc-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Nle-

Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)

Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ [45]

On ajoute 0,46 g de Skatole, 25 ml de sulfure de
15 diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de TFA au
composé [20] préparé dans l'exemple 1 (10,77 g). On
agite à 0°C pendant 10 minutes et à température ambiante
pendant 60 minutes et on concentre sous vide. On ajoute
de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche,
20 on dissout la matière sèche dans le DMF sec (100 ml) et on
neutralise à pH 7 par addition de NMM. On ajoute 0,51 g
de HOBT et 4,23 g du composé [44], puis 0,70 ml de WSC
à -15°C et on agite à température ambiante. On distille
DMF sous vide, on ajoute de l'eau, on filtre le précipité,
25 on lave à l'eau, on sèche et on obtient le produit [45].

Production : 13,60 g

P.F : 140-155°C

$[\alpha]_D^{28}$: -2,00 (c = 0,56, DMF)

Analyse des amino-acides: Asp 2,96 (3), Ser 0,62 (1),

Glu 3,02 (3), Val 1,72 (2), Leu 3 (3), Phe 1,06 (1),

Lys 3,01 (3), His 1,43 (2), Arg 1,98 (2), Trp 0,60 (1),

Nle 1,06 (1).

47) PF(8-34): Boc-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Nle-Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ [46]

On ajoute 0,33 g de Skatole, 25 ml de sulfure de diméthyle, 2,5 d'éthanedithiol et 25 ml de TFA au composé [45] (10,60 g), On agite à 0°C pendant 10 minutes et à température ambiante pendant 50 minutes et on concentre sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité, on sèche, on dissout dans 100 ml de DMF sec et on règle à pH 7 en ajoutant NMM avec refroidissement à la glace. On ajoute 0,36 g (2,7 mmoles) de HOBt et 1,76 g (2,7 mmoles) du composé 32 de l'exemple 1, on ajoute à la solution 0,5 ml de WSC à -15°C et on agite à température ambiante pendant 16 heures. On filtre la matière précipitée, on lave à l'eau, on sèche et on précipite de nouveau dans un mélange d'éthanol et d'éther pour obtenir le produit [46].

15 Production 10,94 g
P.F : 143-161°C

$[\alpha]_D^{28}$: -2,01 (c = 0,52, DMF)

Analyse d'acides-amino : Asp 3,87 (4), Ser 0,76 (1),

Glu 3,34 (3), Gly 0,77 (1), Val 1,84 (2),

Leu 4 (4), Phe 1,04 (1), Lys 3,28 (3), His 2,37 (4),

Arg 2,14 (2), Trp 0,73 (1), Nle 2,07 (2).

48) Protégé - $[Nle^8, Nle^{18}]$ -h-PTH(1-34)NH₂: Boc-Ser(Bzl)-

Val-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-

Leu-Gly-Lys(Z-Cl)-His-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Nle-

Glu(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Tos)-

Lys(Z-Cl)-Lys(Z-Cl)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-

Asn-Phe-NH₂ [47]

On ajoute 0,30 g de Skatole, 25 ml de sulfure de diméthyle, 2,5 ml d'éthanedithiol et 25 ml de TFA au composé [46] (10,86 g) avec refroidissement à la glace, on agite à température ambiante pendant 60 minutes et
 5 on concentre sous vide. On ajoute de l'éther au résidu, on filtre le précipité et on sèche. On dissout la matière séchée dans un mélange de 100 ml de DMF sec et 10 ml de DMSO et on règle à pH 7 en ajoutant NMM avec refroidissement à la glace. On ajoute 0,37 g de HOBt et 3,14 g
 10 du composé [41] de l'exemple 1, puis on ajoute 0,51 ml de WSC à -15°C, on agite à température ambiante pendant 16 heures, on ajoute de l'eau au mélange de réaction, on filtre le précipité, on lave à l'eau, puis on lave avec un mélange d'éthanol et d'éther et on obtient le produit [47].

Production : 12,87 g

P.F : 141-171°C

$[\alpha]_D^{28}$: -1,97° (c = 0,71, DMF)

Analyse des amino-acides : Asp 3,72 (4), Ser 2,76 (3),
5 Glu 5,58 (5), Gly 0,69 (1), Val 2,86 (3), Ile 1,11 (1),
Leu 5 (5), Phe 1,01 (1), Lys 2,87 (3), His 2,19 (3),
Arg 2,06 (2), Trp 0,65 (1), Nle 1,96 (2).

48) [Nle⁸, Nle¹⁸]-h-PTH(1-34)NH₂

On ajoute 3,5 ml d'anisole, 0,35 ml d'éthanedithiol,
10 3,5 ml de sulfure de diméthyle et 35 ml de HF anhydre au
composé [47] (2,9 g) à 0°C et on agite pendant 60 minutes.
On distille HF sous vide, on ajoute de l'éther au résidu,
on recueille le précipité et on dissout dans l'acide
acétique au dixième. On fait passer la solution par une
15 colonne (3,5 x 12 cm) de Dowex X1 du type acétate, on re-
cueille les fractions positives à la ninhydrine et on lyo-
philise pour obtenir 1,87 g de produit brut. On dissout
dans 50 ml d'acide acétique au dixième et on charge sur
une colonne (2 x 33 cm) de CM-cellulose, puis on élue
20 avec un gradient linéaire d'acétate d'ammonium 0,05 M
(pH 5,1, 1 litre) à l'acétate d'ammonium 0,4 M (pH 6,0,
1 litre). On fractionne chaque fraction de 9,0 ml et on
recueille et on lyophilise les fractions n° 74 à 84 pré-
sautant environ $Rf_8 = 0,28$. On dissout la poudre lyophi-
25 lisée dans un peu d'acide chlorhydrique au dixième et on
charge sur une colonne (3 x 115 cm) de Sephadex G-25 et
on élue avec l'acide acétique au dixième. On recueille

les fractions possédant un pouvoir absorbant à 280 nm dans un pic majeur et on lyophilise pour obtenir le composé du titre.

Production : 140 mg

5 ccm : $R_{f_g} = 0,28$

Analyse des amino-acides (hydrolysés par HCl hexanormal contenant 3% d'acide thioglycolique) :

Asp 3,98 (4), Ser 2,10 (3), Glu 4,93 (5), Gly 0,97 (1),
Val 2,66 (3), Ile 0,87 (1), Leu 5,00 (5), Phe 1,01 (1),

10 Lys 3,26 (3), His 2,30 (3), Arg 2,03 (2), Trp 0,62 (1),
Nle 2,22 (2).

CLHP : colonne ; Nucléosile 5C18 (4mm DI x 150 mm)

tampon : 0,1% d'acide acétique-acétonitrile contenant du phosphate 0,1 M (rapport de l'acétonitrile : 5 premières

15 minutes 20%, 20 minutes suivantes 20 à 40%, gradient linéaire)

débit : 1 ml/min

détection : 225 nm

résultat : pic unique à 18,96 min.

REVENDICATIONS

1. Peptide, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-
His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-
5 Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-A-NH₂ ,

dans laquelle A représente Tyr ou Phe, ou un sel de celui-ci.

2. Composé [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]-h-PTH(1-34)NH₂,
caractérisé en ce qu'il est marqué à l'iode-125.